

明 細 書

染色薄片標本の変性部位計測自動化手法

技術分野

[0001] 本発明は、生体の切片サンプルなどの、染料を用いて染色した染色薄片標本の探索、撮像に関する。

背景技術

[0002] 生体の切片サンプルのように、染料を用いて染色した多数の染色薄片標本について、変色部の観察を行うことにより、変性や遺伝子の発現を検査・特定あるいは比較できる。生体切片サンプルでは、微細な領域を観察する(画像を取得する)ツールとしては、顕微鏡程度しか存在しない。特開昭60-79320号公報には、顕微鏡で観察するシステムが記載されている。また、特開2003-295063号公報に記載された顕微鏡装置では、2次元CCDセンサとラインセンサとを備え、2次元CCDセンサの撮像領域の画像を見て、ラインセンサ4による撮像領域を設定する。そして、撮像領域内でラインセンサの位置を順次移動して画像を撮影し、得られた画像を合成する。

[0003] 組織・免疫の研究においては、多数のプレパラートの特定部位を探索・撮像し、データを保存する必要がある。この作業には多大の手間がかかる。そこで、特開昭60-79320号公報に記載されたシステムでは、ローダーとアンローダーを用いてサンプルを自動的に供給する。

特許文献1: 特開昭60-79320号公報

特許文献2: 特開2003-295063号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0004] しかし、生体切片サンプルについて微細な領域を観察するとき、顕微鏡の限られた視野では、明らかな変性部位と未変性部位を同時に観察することはできなかった。これを補うために顕微鏡から得られた画像をモザイク状に合成し広い視野の画像を得ることができる。この場合、観察範囲が画角の制限から小さくなってしまうため、多数の画像をコンピュータ上で接続する必要がある。しかし、できた画像の画質が悪い、

接続に逆に手間取るなどの問題があった。また、顕微鏡視野内では照明が一樣ではないため、色調の不連続なクオリティの低いモザイク画像しか得られず、全体を画像処理して比較することはできなかった。したがって、従来は自動的な検査などは困難であった。

[0005] この発明の目的は、多数の染色薄片標本の変性部位を自動的に計測できるようにすることである。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明に係る変性部位計測方法では、(1)染色薄片標本の基準試料の画像データについて、指定された変性部について色領域情報を求め、(2)前記の基準試料の画像データについて、指定された未変性部について色情報を求める。次に、(3)試料の画像データについて、指定された未変性部の色情報を求め、(4)前記の基準試料の未変性部の色情報と比較して、前記の試料の未変性部の色調と明度を前記の基準試料の未変性部の色調と明度と合わせるための色補正量を計算し、前記の試料の画像データを前記の色補正量で色補正をする。次に、(5)色補正された前記の試料の画像データから、前記の基準試料の色領域情報を基に変性部を抽出する。

[0007] 前記の変性部位計測方法において、好ましくは、さらに、前記の試料の色補正された画像データについてスコア値を計算する。

[0008] 前記の変性部位計測方法において、好ましくは、さらに、前記の基準試料の画像データについて、指定された未変性部について位置と形状を求め、前記の試料について、基準試料の未変性部の位置と形状のデータを基にマッチング計算をして未変性部を指定する。

[0009] 本発明に係る変性部位計測装置は、染色薄片標本の基準試料の画像データについて、指定された変性部について色領域情報を求める第1変性部色領域情報検出手段と、前記の基準試料の画像データについて、指定された未変性部について色情報を求める第1未変性部色領域情報検出手段と、染色薄片標本の試料の画像データについて、指定された未変性部について色領域情報を求める第2未変性部色領域情報検出手段と、前記の基準試料の未変性部の色調と明度と合わせるための色補正量を計算し、前記の試料の画像データを前記の色補正量で色補正をする色補

正手段と、色補正手段により色補正された前記の試料の画像データから、前記の基準試料の色領域情報を基に変性部を抽出する変性部抽出手段とからなる。

[0010] 前記の変性部位計測装置において、好ましくは、さらに、プレパラート上の試料全体の画像を連続して継ぎ目なく取得するスキャナと、複数枚のプレパラートをストックしておき、1枚ずつスキャナに自動的に搬送して、スキャナによる撮像の後に排出するプレパラート自動搬送装置とを備える。

[0011] 前記の変性部位計測装置において、好ましくは、前記のプレパラートは、その側部がプレパラートの厚さより厚いケースに支持される。

[0012] なお、この発明の以上に説明した種々の構成要素は、可能な限り組み合わせることができる。

発明の効果

[0013] 試料の未変性部の色調と明度を基準試料の未変性部の色調と明度と合わせることで、切片の厚さによる違い・染色条件による染まり方・濃度の違いをキャンセルでき、したがって、試料の間での定量的な差異を検出できる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]変性部位計測システムのブロック図である。

[図2]染色薄片標本の1例の図である。

[図3]複数の試料を備えるプレパラートの1例の図である。

[図4]プレパラートスキャナのプレパラート搬送系を示す図である。

[図5]カバー付きプレパラートの平面図である。

[図6]カバー付きプレパラートの断面図である。

[図7]プレパラートスキャナのプレパラート搬送装置の制御のフローチャートである。

[図8]プレパラートスキャナのスキャナ部の制御のフローチャートである。

[図9]画像処理装置の画像処理のフローチャートである。

符号の説明

[0015] 10 プレパラートスキャナ、 22 画像処理装置、 12 プレパラート搬送装置、
14 制御装置、 15 スライドテーブル、 16 スキャナ、 18 制御装置、
24 CPU、 28 ディスプレイ装置、 30 ハードディスク装置、 40 サンプ

ル、 42 変性部、 50 プレパラート、 52 試料、 138 プラスチックケース付きプレパラート、 142 プレパラート。

発明を実施するための最良の形態

- [0016] 以下、本発明の実施の形態を添付の図面を参照して説明する。なお、図面において、同じ参照記号は同一または同等のものを示す。
- [0017] 本発明に係る変性部位計測自動化システムでは、生体の切片サンプルなどの、染料を用いて染色した多数の染色薄片標本について、変色部の観察を行い、変性や遺伝子の発現を検査・特定あるいは比較する。このシステムを用いると、たとえば、多サンプルの網羅的解析（スクリーニング作業等）を効率的に行える。
- [0018] 図1は、変性部位計測自動化システムの構成を図式的に示す。このシステムは、プレパラートスキャナ10と画像処理装置22とからなり、プレパラートを連続的に処理する機能を備える。プレパラートスキャナ10は、プレパラート搬送装置12とスキャナ16とからなる。プレパラート搬送装置12は、CPUを含む制御装置14により制御され、複数枚のプレパラートをストックしておくと、プレパラートを1枚ずつ自動的にスキャナ16へ搬送する。スキャナ16は、CPUを含む制御装置18により制御され、搬送されてきたプレパラートを読み取り位置で連続してスキャンし、画像センサ（たとえばR、G、Bの1次元CCDセンサ）を用いてプレパラート上の試料の画像を短時間に継ぎ目なく取得し、画像データを記憶装置に格納する。これにより、試料全体の高品質の画像を取り込む。一度に組織切片全体をスキャンできるため、色ムラのない切片全体像が得られる。計測が終了したプレパラートはスキャナ16からプレパラート搬送装置12に返送される。なお、操作者は、操作パネル20により各種指示を入力する。なお、スキャナ16として、通常の画像読み取り機構を用いる。図示しないが、読み取り位置の下に設けられる光源からプレパラートを照射し、プレパラートを透過した光を光学系を介して画像センサに入射させる。画像センサの電気信号がデジタル信号に変換されて記憶装置に格納される。
- [0019] 画像処理装置22は、プレパラートスキャナ10により得られた画像データを解析する。画像処理装置22は通常のコンピュータと同様の構成を備え、全体を制御するCPU 24、入力装置であるキーボード26、表示のためのディスプレイ装置28、画像処理ブ

ログラム、画像データなどを記憶する記憶手段であるハードディスク装置30、及び、プレパラートスキャナ10と通信をするための通信部32を備える。後で説明するように、画像データの処理において、測定された複数の標本の間で、変性や遺伝子発現のない部分(未変性部位)の色調・明度を合わせることで、切片の厚さによる違い・染色条件による染まり方・濃度の違いをキャンセルする。次に、未変性部位の色調・明度を合わせた画像について、変性部位の色を比較する。これにより、サンプル間での定量的な差異を検出できる。

[0020] 図2は、染色薄片標本の1例を示す。このサンプル40では、色の薄い未変性部の中に、色の濃い変性部42が存在する。また、図3は、プレパラート50の上にランダムに配置された複数の試料52を示す。このように、生体切片サンプルは、撮像対象としては、形状の再現性があまりないものである。

[0021] 図4は、プレパラート搬送装置12の構成の概略を示す。このプレパラート搬送装置12は、第1収納ストッカー(ローダー)120、第2収納ストッカー(アンローダー)122およびプッシャ124からなる。収納ストッカー120、122には、たとえば100枚のプレパラートが収納される。なお、実際には、プラスチックケース入りプレパラート138が収納される。第1収納ストッカー120は、縦方向に多数のプレパラートを順次重ねて載せる支持台126と、モータ128により回転される垂直方向の回転軸(図示しない)とを備え、支持台126は、回転軸に刻まれたネジと係合して、モータ128により上下に昇降される。同様に、第2収納ストッカー122は、縦方向に多数のプレパラートを順次重ねて載せる支持台130と、モータ132により回転される垂直方向の回転軸(図示しない)とを備え、支持台130は、回転軸に刻まれたネジと係合して、モータ132により上下に昇降される。プッシャ124は、モータ134により図の左右方向に駆動され、垂直に配置される板部材136により、プレパラート138を第1収納ストッカー120からスライドテーブル15の上面にあるステージへ、また、スライドテーブル15のステージから第2収納ストッカー122へ移載する。プッシャ124は、図に示される状態では、第1収納ストッカー120の最も上にあるプレパラートを移動可能な位置、スライドテーブル15のステージ上にあるプレパラートを移動可能な位置、また、第2収納ストッカー122の最も上にプレパラートを移動した位置に示されている。スライドテーブル15は、図示しな

いモータにより供給位置からスキャン位置の方に(図4では紙面に垂直な方向に)またはその逆方向に移動される。

[0022] 図5と図6は、プラスチックケース付きプレパラート138の平面図と断面図である。プレパラート142は通常は約1mmの厚さである。プッシャ124の板部材136とスライドテーブル15のステージとの隙間を0.5mmとすると、プッシャ124の動作において高い位置精度が必要となり、また、そのようなプレパラートを直接プッシャ124の板部材136により水平方向に移載しようとする、安定な作業が困難である。そこで、長方形のプラスチックケース140に長方形のプレパラート142を保持する。図に示す例では、プラスチックケース140の中央部に、長方形のプレパラートを受け入れるコの字型の枠を設け、枠の内周にそって、プラスチックを挿入可能な溝を設ける。そして、プレパラート142を溝と係合させてケース140に安定に保持する。なお、保持方法は上述の方式には限られない。

[0023] このプラスチックケース付きプレパラートでは、プッシャ124の板部材136は、ケース140の側部に当たってケース140を押す。したがって、プラスチックケース140の厚さは、板部材136とスライドテーブル15との隙間より十分大きくし、たとえば約2mmである。これは、ケース140を安定して板部材136に当てることができる厚さである。

[0024] 上述のプレパラートスキャナ10は、操作者が複数枚のプラスチックケース入りプレパラート138を収納ストッカー120にセットする(準備)と、自動で以下の動作を行える。

(1) 自動で第1収納ストッカー120から1枚のプラスチックケース入りプレパラートをスライドテーブル15上へ搬送する。

(2) スライドテーブル15を読み取り位置に移動し、自動でプレパラート上の試料の画像を取り込む。まず全体をプリスキャンし、次に、試料の画像(特定部位の画像)をスキャンし、得られた画像データを記憶装置に保存する。

(3) 測定が終わると、スライドテーブル15を供給位置に移動し、自動でプラスチックケース入りプレパラート138をスキャナ16から第2収納ストッカー122に搬送する。

[0025] 図7は、プレパラート搬送装置12の制御部4によるプレパラート搬送の制御のフローチャートを示す。まず、供給位置へスライドテーブル15を移動する(S10)。次に、

第1収納ストッカー（供給側ストッカー）120を1ピッチ（すなわち1枚のプラスチックケース入りプレパラートの厚さ）上昇して（S12）、プッシャ124が接触できるようにする。次に、プッシャ124に供給動作を行わせて（S14）、供給側ストッカー120の最上部にあるプレパラートをプッシャ124でスライドテーブル15のステージ上の所定位置まで押す。

[0026] 次に、プレパラートのセットを完了する（S16）。次に、読み取り位置へプレパラートすなわちスライドテーブル15を移動して（S18）、スライドテーブル15上のプレパラートをスキャナ16の読み取り位置にセットする。次に、スキャナ16を動作させる（S20）。こうして、プレパラート上の試料の画像を読み取る。

[0027] 読み取りが終わると、次に、供給位置へステージ（スライドテーブル15）を戻す（S22）。次に、多重スキャンか否かを判断する（S24）。多重スキャンの場合は、プッシャ124に押し出し動作を行わせて（S26）、プレパラート上の読み取り位置をずらす。次に、ステップS18に戻り、読み取りを行う。

[0028] 多重スキャンでない場合は、次に、第2収納ストッカー（収納側ストッカー）122を1ピッチ下降する（S28）。次に、プッシャ124に取り出し動作を行わせ（S30）、プレパラートをスライドテーブル15のステージから収納側ストッカー122まで押してストッカー122に収納する。次に、ストッカー位置番号に1を加算する（S32）。

[0029] 次に、供給側ストッカー120が最終位置か否かを判断し（S36）、最終位置でなければ、ステップS18に戻り、次のプレパラートについて読み取りを行う。最終位置であれば、搬送制御を終了する。

[0030] 図8は、スキャナ16の制御部18による画像撮像の制御のフローチャートである。プレパラートがスライドテーブル15のステージ上にセットされると、まず、高速で（粗く）プレスキャンを行い（S100）、得られた画像データからプレパラート上の試料の位置を自動認識する（S102）。次に、得られた試料位置に基づいて試料の本スキャン（精細スキャン）を行う（S104）。ここで、1枚のプレパラートに複数の組織切片の試料がある場合は、本スキャンを、認識された試料分繰り返す（S104ーS106）。すなわち、プレパラートの読み取り位置がずらされるごとに、ステップS104に戻り、本スキャンを行う。これを、プレパラート全面をカバーするまで繰り返す。次に、各本スキャンで得られ

た短冊状の試料画像を合成し(S108)、得られた合成画像を記憶装置(たとえばディスク)に保存する(S110)。保存する画像は、プレパレート全面のイメージ(プレスキャンの低解像イメージ)、個々の試料のサムネイル画像(プレスキャン時の低解像イメージ)および個々の試料の精細画像(合成画像)である。

- [0031] 図9は、画像処理装置22における画像解析のフローチャートである。まず、操作者により選択されたいずれかの試料(基準試料)の画像データを取り込む(S200)。基準試料画像データは、スキャナ16により読み込まれたデータであるが、カメラなどにより画像を撮影したデータ、または、記憶装置などに記憶されていたデータであってもよい。次に、基準試料の変性・変色部を操作者が操作パネル20で指定すると、それに基づいて変性・変色部の色領域情報を記憶しておく(S202)。この色領域情報は、指定された変性・変色部の色を含む色領域を示す。そして、その色領域情報を基にスコア値を計算して基準試料の中の変性・変色部を抽出する(S204)。なお、スコア計算のため、基準試料の画像について、スコア計算を行う発現部位をティーチングしておく。発現部位のティーチングでは、マウスを用いて発現部位をピックし、同様の色成分を抽出することで行う。発現部位を際立たせるため、簡単な画像処理を行ってもよい。次に、基準試料の1ヶ所または複数箇所の変性や遺伝子発現のない部分(未変性部位)を操作者が操作パネル20で(たとえば多角形または楕円形で)指定すると、その未変性部位の位置・形状と色領域情報とをそれぞれ記憶しておく(S206)。

- [0032] 次に、試料画像を取り込む(S208)。試料画像は、スキャナ16により読み込まれたデータであるが、カメラなどにより撮影した画像データ、または、記憶装置などに記憶されていたデータであってもよい。次に、未変性部位指定方法により分岐する(S210)。自動指定なら、ステップS206で記憶してある基準試料の未変性部位の位置・形状を用いて、マッチング計算による自動領域指定を行い(S212)、一方、手動指定なら、手動領域指定を行う(S214)。次に、基準試料の無変位部位の色情報を用いて、未変性部の色を比較して、複数の標本の間で、変性や遺伝子発現のない部分(未変性部位)の色調・明度を合わせるための色補正量を計算する(S216)。これにより、切片の厚さによる違い・染色条件による染まり方・濃度の違いをキャンセルする。次

に、この色補正量を用いて試料画像の色補正を行う(S218)。

[0033] 次に、変性・変色部の色領域情報を用いて試料画像の変性・変色部を抽出する(S122)。そして、試料画像のスコア値を計算する(S124)。ここで、組織切片を複数領域に分け各領域で発現量を数値化する。スコア値の比較の結果に基づいて、サンプル間での定量的な差異を検出する。

[0034] 次に、全試料の測定が終了したか否かを判断する(S126)。終了していなければ、ステップS208に戻り、試料画像データの処理を続ける。

[0035] 眼により変性部の有無を判断する手法と比較すると、判断基準が一定となる。したがって、全体に染まった試料と、少く染まった試料とを同じ基準で判断できる。したがって、スクリーニング作業等を定量的に行える。

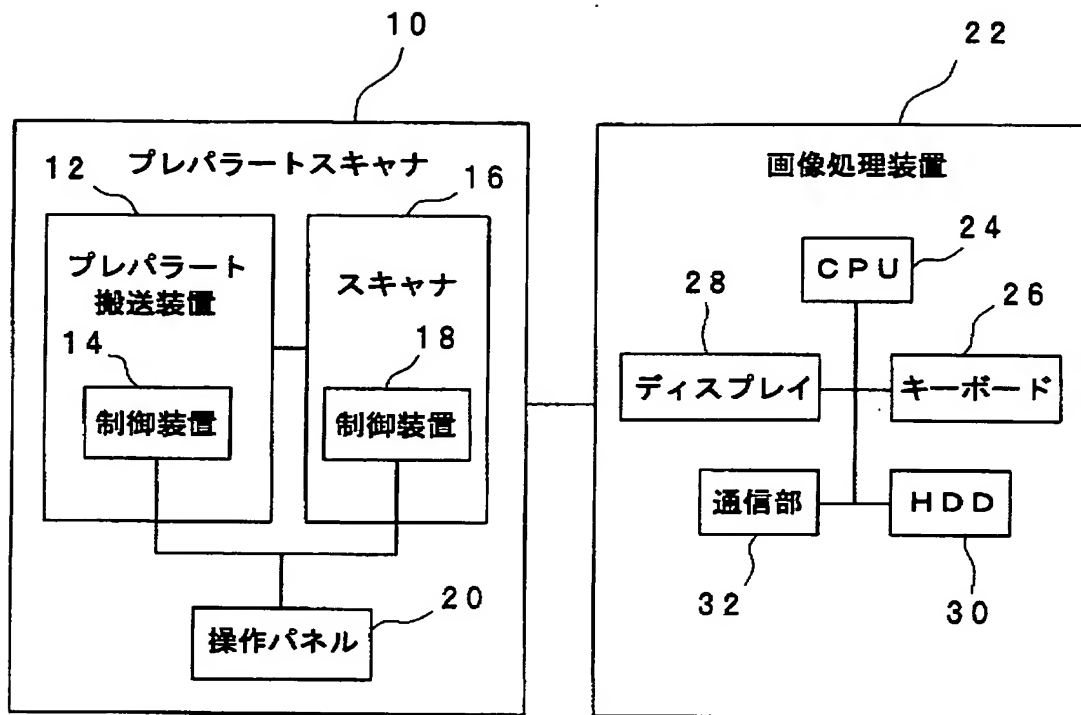
請求の範囲

- [1] 染色薄片標本の基準試料の画像データについて、指定された変性部について色領域情報を求め、
- 前記の基準試料の画像データについて、指定された未変性部について色情報を求め、
- 次に、試料の画像データについて、指定された未変性部の色情報を求め、
- 前記の基準試料の未変性部の色情報と比較して、前記の試料の未変性部の色調と明度を前記の基準試料の未変性部の色調と明度と合わせるための色補正量を計算し、前記の試料の画像データを前記の色補正量で色補正をし、
- 次に、色補正された前記の試料の画像データから、前記の基準試料の色領域情報を基に変性部を抽出する、
- 変性部位計測方法。
- [2] さらに、前記の試料の色補正された画像データについてスコア値を計算することを特徴とする請求項1に記載された変性部位計測方法。
- [3] さらに、前記の基準試料の画像データについて、指定された未変性部について位置と形状を求め、
- 前記の試料について、基準試料の未変性部の位置と形状のデータを基にマッチング計算をして未変性部を指定することを特徴とする請求項1に記載された変性部位計測方法。
- [4] 染色薄片標本の基準試料の画像データについて、指定された変性部について色領域情報を求める第1変性部色領域情報検出手段と、
- 前記の基準試料の画像データについて、指定された未変性部について色情報を求める第1未変性部色領域情報検出手段と、
- 染色薄片標本の試料の画像データについて、指定された未変性部について色領域情報を求める第2未変性部色領域情報検出手段と、
- 前記の基準試料の未変性部の色調と明度と合わせるための色補正量を計算し、前記の試料の画像データを前記の色補正量で色補正をする色補正手段と、
- 色補正手段により色補正された前記の試料の画像データから、前記の基準試料の

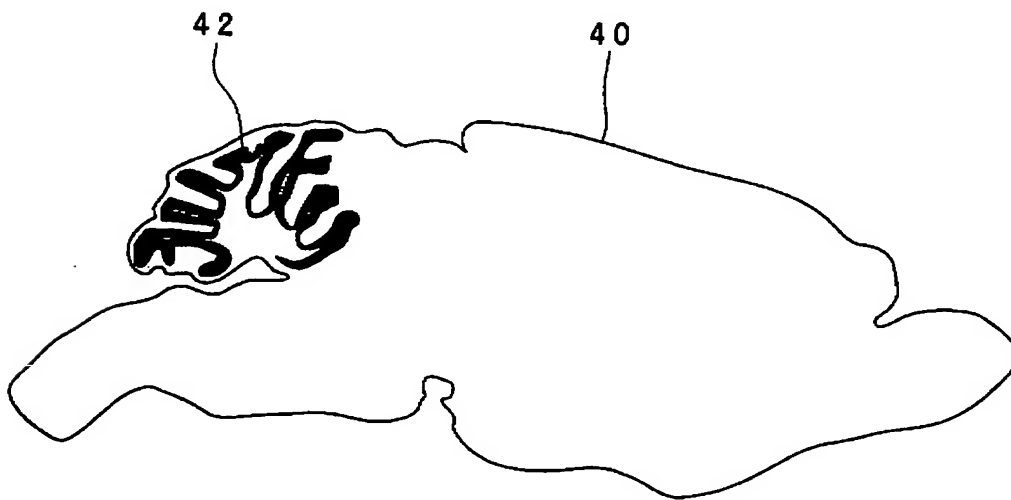
色領域情報を基に変性部を抽出する変性部抽出手段とからなる
変性部位計測装置。

- [5] さらに、
プレパラート上の試料全体の画像を連続して継ぎ目なく取得するスキャナと、
複数枚のプレパラートをストックしておき、1枚ずつスキャナに自動的に搬送して、ス
キャナによる撮像の後に排出するプレパラート自動搬送装置と
を備える、請求項4に記載された変性部位計測装置。
- [6] 前記のプレパラートは、その側部がプレパラートの厚さより厚いケースに支持されるこ
とを特徴とする請求項5に記載された変性部位計測装置。

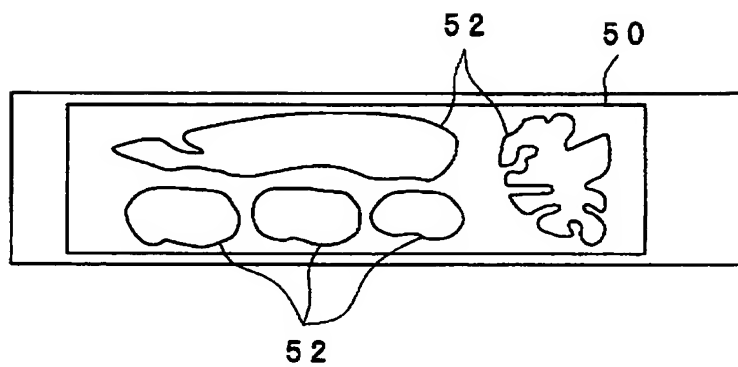
【図1】



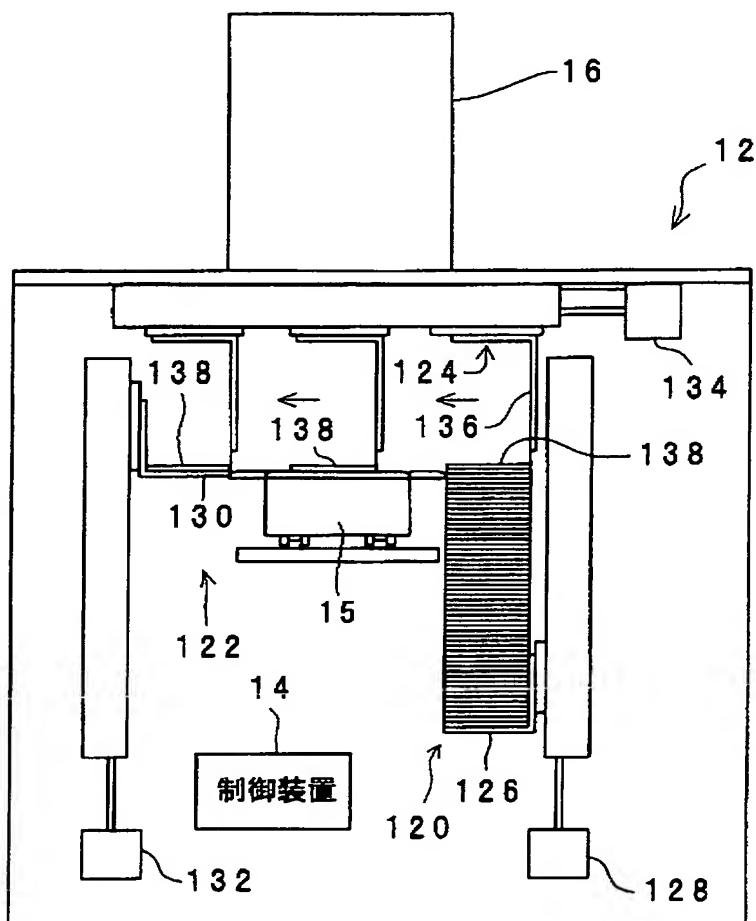
【図2】



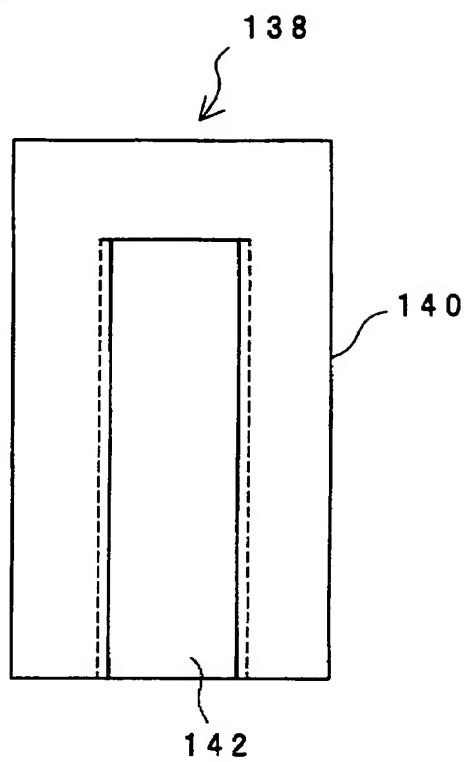
[図3]



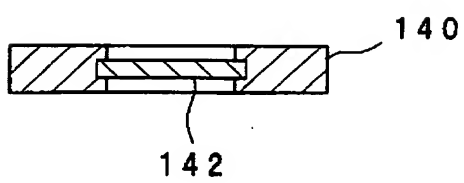
[図4]



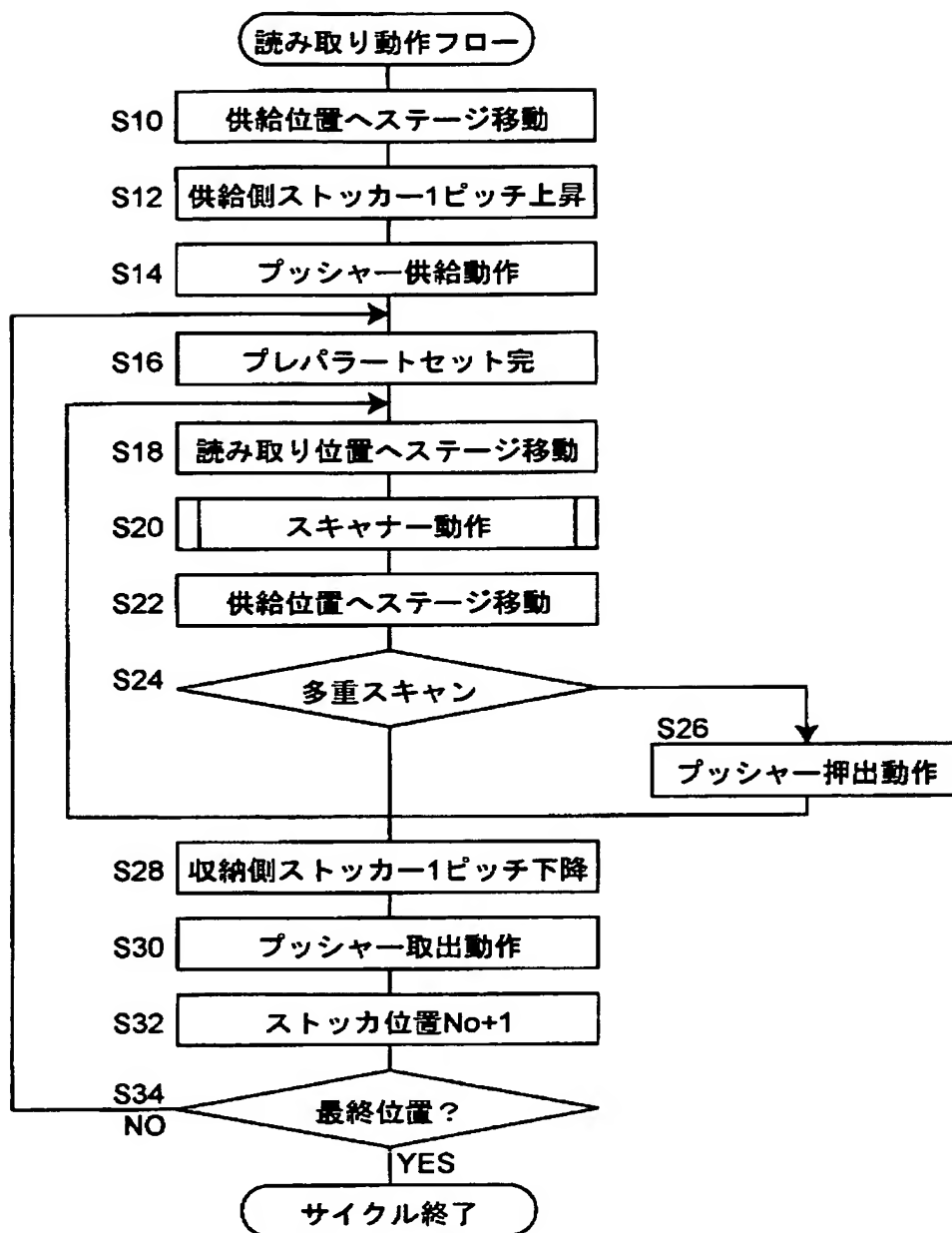
[図5]



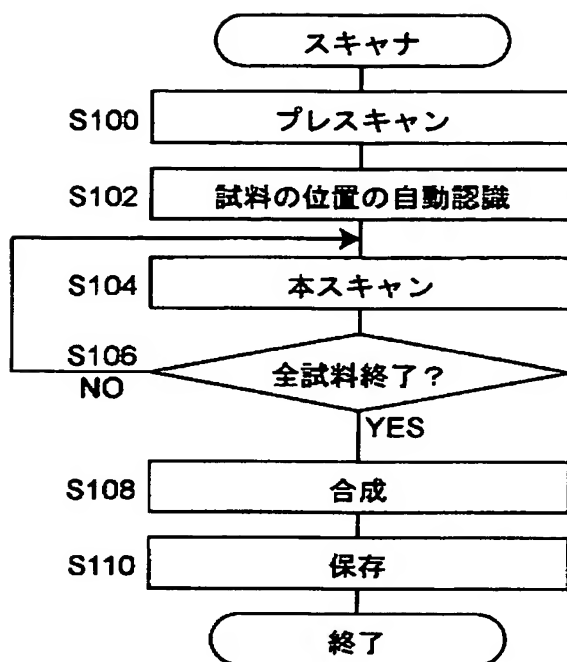
[図6]



[図7]



[図8]



[図9]

